

# 網膜色素変性症における光受容細胞特異的レチノール脱水素酵素遺伝子の解析

|     |   |
|-----|---|
| 著者  | 石黒 誠一   |
| URL | <a href="http://hdl.handle.net/10097/41297">http://hdl.handle.net/10097/41297</a> |

# 網膜色素変性症における光受容細胞特異的レチノール脱水 素酵素遺伝子の解析

(課題番号：05454467)

平成5年度～平成6年度科学研究費補助金（一般研究B）

## 研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 石黒誠一

（東北大学医学部講師）

平成5年度～平成6年度科学研究費補助金（一般研究B）  
研究成果報告書

I. 研究課題：網膜色素変性症における光受容細胞特異的レチノール脱水  
素酵素遺伝子の解析

II. 課題番号：05454467

III. 研究組織

研究代表者：石黒誠一（東北大学医学部講師）

研究分担者：玉井 信（東北大学医学部教授）

IV. 研究経費

平成5年度 5,000千円

平成6年度 1,700千円

計 6,200千円

V. 研究発表

Isomerization of 11-cis-retinol to all-trans-retinol in bovine rod outer segments.

Takako Shimizu, Sei-ichi Ishiguro, Makoto Tamai

Journal of Biochemistry (Tokyo), in press.

東北大学図書



00010132086

附属図書館

## VI. 研究の目的

ビタミンA（全トランスレチノール）は、視覚過程に置いて必要不可欠な成分で、脊椎動物では主に網膜と色素上皮細胞にみられる。レチノール脱水素酵素は、レチノールとレチナールとの間の相互転換を触媒し、これらの2つの成分の間の機能的関係に置いて重要な役割を担っている。この酵素は、少なくとも2つの種類が報告されており、1つは視細胞桿体外節膜に存在し、もう1つは網膜色素上皮細胞に存在する。外節内の酵素は、ロドプシンが光退色するときに生じる全トランス型レチナールを全トランス型レチノールへと変換し、色素上皮細胞内の酵素は11-シス型レチノールを11-シス型レチナールに変換している。我々は、これらの酵素を精製し、抗体を作成し、その性質を調べてきた。

光照射に伴い、ロドプシンから放出される全トランス型レチナールはアルデヒドであるため細胞に対する毒性が強いと考えられる。したがって、我々はこの毒性のあるレチナールを比較的毒性の低いレチノールに変えるレチノール脱水素酵素の欠損が網膜色素変性症の原因の1つであると考え、まず、特異的な抗体を用いてウシのレチノール脱水素酵素のcDNAをクローニングし、その構造解析を行うことを最初の目的とした。得られたcDNAをプローブとして、網膜色素変性症患者の末梢血から分離されたDNAをPCR法により増幅し、レチノール脱水素酵素の突然変異を見つけだすことを将来の最終目標に置いた。

## VII. 研究成果

Uni-ZAP XRウシ網膜cDNAライブラリーからラット抗レチノール脱水素酵素抗体を用いてスクリーニングを行った。20個の陽性プラークが分離され、*in vivo excision*によってpBluescript SK-ファージミドを得た。M13プライマーを用い、ジデオキシヌクレオチド法によりファルマシア社製のDNAシーケンサーで塩基配列を決定した。4つのクローンの塩基配列を決定したが、これらの塩基配列はお互いにオーバーラップしていた。これらのクローンの中でclone 18が最も長いインサートを持っていた。翻訳開始点から3ヌクレオチド上流はプリン残基のAでコザックの法則に従っていた（図1）。

20  $\mu$ gの精製したレチノール脱水素酵素をPVDF膜に吸着させ、N末端からのアミノ酸配列を決定するためにアミノ酸シーケンサーにかけた。図1のアンダーラインの引いてあるアミノ酸がタンパク質から得られたアミノ酸配列で、DNA塩基配列から得られた結果とよく一致していた。レチノール脱水素酵素のアミノ酸配列にはshort chain alcohol dehydrogenaseの活性部位として知られる構造（SCADs）が含まれており、このファミリーの一員と考えられた。レチノール脱水素酵素の91から94のアミノ酸残基（Y-A-K-W-K）はY-X-X-X-Kモチーフによく一致している。しかしながら、NADやNADPなどの補酵素の結合部位である典型的なGX<sub>3</sub>GXG構造は見られなかった。C末端近くにあるGXAXXXG（340-346）またはG(A)XXXGX（336-342）が結合部位である可能性がある。

我々がスクリーニングに用いた抗体はポリクローナル抗体なので他のクローンを拾い上げてしまう可能性がある。そこで、我々は新たにレチノール脱水素酵素に対する単クローン抗体を作成した。8.3  $\mu$ gのタンパク質を含む部分精製されたレチノール脱水素酵素と得られた単クローン抗体4G2、さらにヒツジ抗マウス血清を加え、4℃で一晩インキュベートした。12,000rpmで10分間遠心分離した後、上清を50  $\mu$ l取り、レチノール脱水素酵素の酸化反応を測定した。図2aに示されるように、単クローン抗体4G2は抗原であるレチノール脱水素酵素とよく反応し、効率よく免疫沈殿を形成することが出来た(黒丸)。一方、色素上皮細胞のレチノール脱水素酵素に対する単クローン抗体4A11(Suzuki, Ishiguro and Tamai, BBA 1163: 201-208, 1993に報告)を用いると視細胞に特異的なレチノール脱水素酵素活性は全く落ちなかった(白丸)。この事は単クローン抗体4G2が視細胞のレチノール脱水素酵素に対する特異的抗体であることを示している。

次に、レチノール脱水素酵素のcDNAをCHO細胞で安定に発現させ、レチノール脱水素活性を測定するため、レチノール脱水素酵素のcDNAのcoding regionを真核生物の発現ベクターであるpcDNA1に挿入した。形質導入した細胞におけるレチノール脱水素酵素分子の発現はウエスタンブロットティング法と免疫組織化学法で確かめた(図2b-e)。実験は以下の様に行った。5%のウシ胎児血清を補ったMEM培地でsubconfluentになるまでCHO細胞を培養し、そこに20  $\mu$ gのretinol dehydrogenase cDNA-inserted pcDNA1と5  $\mu$ gのネオマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドをco-transfectした。導入には陽イオン性リポソームを用いた。選択培地として400  $\mu$ g/mlのG418を含む培地を用いた。この方法により、いくつかのレチノール脱水素酵素遺伝子導入細胞(CHOpcROSRDH cells)が得られた。CHOpcROSRDH細胞およびコントロールのCHO細胞をシャーレで培養し、ダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液で3回洗い、スクレーパーで細胞をかき集め、3,000rpm、10分間の遠心分離により細胞を沈殿させた。細胞膜分画を得るため、凍結融解を繰り返した後ホモジナイズし、100,000xgで1時間遠心分離してペレットを集めた。精製したウシ視細胞外節(80  $\mu$ g)、CHOpcROSRDH細胞の膜分画(5.5 mg)、コントロールのCHO細胞の膜分画(5.5 mg)を1 mlの3%Emulphogeneおよび0.15M塩化ナトリウムを含む0.05 M トリス塩酸緩衝液(可溶化溶液)で可溶化した。12,000rpm、10分間の遠心分離後、上清を集めた。この上清に5  $\mu$ gの4G2抗体または4A11抗体を加え、さらに10  $\mu$ lのprotein G-Sepharoseを加えて4℃、一晩攪拌した。レチノール脱水素酵素が吸着したprotein G-Sepharoseを可溶化溶液で洗い、さらに水で洗ってから10  $\mu$ lのSDS電気泳動用のサンプルbufferで可溶化した。5  $\mu$ lの試料をSDS電気泳動にかけ、PVDF膜に電氣的に転写した。レチノール脱水素酵素を免疫学的に染色するために、我々は1次抗体として0.1  $\mu$ g/mlの4G2抗体、2次抗体として5000倍希釈したビオチン化ヤギ抗マウスIgG、さらにavidin-biotin-alkaline phosphatase complexを反応させてBCIP/NBTを用いて発色させた(図2b)。図2bで1と2はCHOpcROSRDH細胞、3

と4はコントロールのCHO細胞、5と6は視細胞外節を用いた。1、3、5は視細胞のレチノール脱水素酵素に対する抗体4G2で処理したもの。2、4、6は色素上皮細胞のレチノール脱水素酵素に対する抗体4A11で処理したもの。Hは抗体のheavy chain、Lは抗体のlight chainを示している。矢印で示されているように、レチノール脱水素酵素の免疫染色は免疫沈降に4G2抗体を使った場合のCHOpCROSRDH細胞と視細胞外節に見られることから、CHOpCROSRDH細胞で視細胞のレチノール脱水素酵素の発現があることがわかった。

我々は、もう一つの免疫組織化学的方法でもCHOpCROSRDH細胞で視細胞のレチノール脱水素酵素の発現があることを確かめた(図2c-e)。シャーレに付着したままCHOpCROSRDH細胞とコントロールのCHO細胞を70%のエタノールで20分間固定した。1次抗体として0.1  $\mu$ g/mlの4G2抗体またはコントロールとして4A11抗体、2次抗体として200倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgGを反応させ、DABを用いて発色させた。免疫組織化学的反応産物は4G2抗体で処理したCHOpCROSRDH細胞にのみ見られ(図2c)、4G2抗体で処理したCHO細胞(図2d)や4A11抗体で処理したCHOpCROSRDH細胞(図2e)には見られなかった。これらの結果からCHOpCROSRDH細胞で視細胞のレチノール脱水素酵素の発現があることが確かめられた。

視細胞のレチノール脱水素酵素の発現があることが確かめられたCHOpCROSRDH細胞を使ってレチノール脱水素酵素の活性を測定した。上述した方法により細胞の膜分画を集めた。レチノール脱水素酵素の酸化反応は50  $\mu$ lの膜分画(250  $\mu$ g protein)と50  $\mu$ lの基質(10 nmoles of all-trans retinol, 6mM NADP, 1.2% Tween 80, 12% acetone, 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5)を混ぜることによって測定した。反応は37℃で60分間行い、100  $\mu$ lのエタノールを加えることにより反応を停止した。形成されたレチナールは1mlのヘキサンで抽出し、HPLCを用いて解析した。解析の方法はすでに報告してある方法に従った(Suzuki, Ishiguro and Tamai, BBA 1163: 201-208, 1993)。この実験の結果、レチノール脱水素酵素活性はほとんど認められなかった。このことは、(1)発現量が少ないので感度の低い今の測定法では測れない、(2)他の分子との相互作用が必要である、(3)CHO細胞の中でレチノール脱水素酵素の分解・修飾が起こり、抗体では検出されるが活性が無くなる、等のことが考えられ、新たに感度の高いレチノール脱水素酵素活性の測定法を開発する必要性が生じた。



1 GCTGTGGGAGGCTACCTGGACTGCACCCTGCAAGT

36 MetAlaLeuLeuLysValLysPheAspGlnLysLysArgValLysLeuAlaGlnGlyLeu 20  
ATGGCGCTGCTGAAAGTCAAATTTGACCAGAAGAAGCGGGTCAAGTTGGCCCAAGGGCTC

96 TrpLeuMetAsnTrpPheSerValLeuAlaGlyIleIleIlePheGlyLeuGlyLeuPhe 40  
TGGCTCATGAACTGGTTCTCCGTGTTGGCTGGTATCATCATCTTCGGCTTAGGGCTGTTC

156 LeuLysIleGluLeuArgLysArgSerAspValMetAsnAsnSerGluSerHisPheVal 60  
CTGAAGATTGAACTCCGGAAGAGAAGCGATGTGATGAACAATTCTGAGAGCCATTTTGTG

216 ProAsnSerLeuIleGlyValGlyValLeuSerCysValPheAsnSerLeuAlaGlyLys 80  
CCCAATTCCTTGATCGGGGTGGGGGTGCTGTCTGTGTCTTCAATTCTCTGGCTGGCAAG

276 IleCysTyrAspAlaLeuAspProAlaLysTyrAlaLysTrpLysProTrpLeuLysPro 100  
ATCTGTTACGACGCCCTGGACCCTGCCAAGTACGCCAAGTGAAGCCCTGGCTGAAGCCG

336 TyrLeuAlaValCysValLeuPheAsnValValLeuPheLeuValAlaLeuCysCysPhe 120  
TACCTGGCCGTGTGTGTCCTCTTCAACGTGGTCTCTTCTGGTGGCCCTCTGCTGCTTC

396 LeuLeuArgGlySerLeuGluSerThrLeuAlaHisGlyLeuLysAsnGlyMetLysPhe 140  
CTCCTGCGGGGCTCGCTGGAGAGTACGCTGGCCACGGACTCAAGAACGGCATGAAATTC

456 TyrArgAspThrAspThrProGlyArgCysPheMetLysLysThrIleAspMetLeuGln 160  
TATCGGGACACGGACACCCAGGCCGGTGTTCATGAAGAAGACCATCGACATGCTGCAG

516 IleGluPheLysCysCysGlyAsnAsnGlyPheArgAspTrpPheGluIleGlnTrpIle 180  
ATCGAGTTCAAGTGCTGCGGCAACAACGGCTTTTCGGGACTGGTTTGAGATTCAGTGGATC

576 SerAsnArgTyrLeuAspPheSerSerLysGluValLysAspArgIleLysSerAsnVal 200  
AGCAACCGCTATCTGGATTTTTCTCCAAAGAAGTCAAAGATCGCATCAAGAGCAATGTG

636 AspGlyArgTyrLeuValAspGlyValProPheSerCysCysAsnProAsnSerProArg 220  
GACGGGCGGTACCTGGTGGACGGTGTCCCCTTCAGCTGCTGCAACCCCAACTCACCGCGG

696 ProCysIleGlnTyrGlnLeuThrAsnAsnSerAlaHisTyrSerTyrAspHisGlnThr 240  
CCCTGCATCCAGTACCAGCTCACCAACAACCTCTGCGCACTACAGCTACGATCACAGACG

756 GluGluLeuAsnLeuTrpLeuArgGlyCysArgAlaAlaLeuLeuSerTyrTyrSerAsn 260  
GAGGAGCTCAACCTGTGGCTGCGTGGCTGCAGGGCCGCCCTGCTGAGCTATTACAGCAAC

816 LeuMetAsnThrThrGlyAlaValThrLeuLeuValTrpLeuPheGluValThrIleThr 280  
CTCATGAATACTACAGGCGCTGTGACGCTCCTCGTTTGGCTCTTTGAGGTGACCATCACT

876 ValGlyLeuArgTyrLeuHisThrAlaLeuGluGlyMetAlaAsnProGluAspProGlu 300  
GTTGGGCTACGCTACCTGCACACGGCGCTGGAAGGCATGGCCAACCCGAAGACCCTGAG

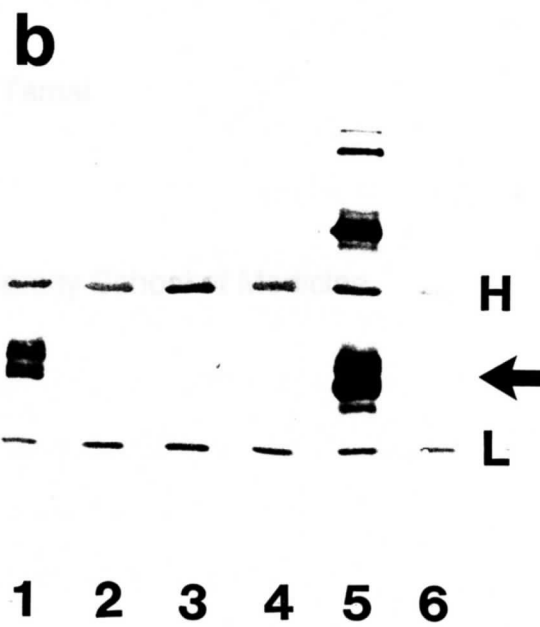
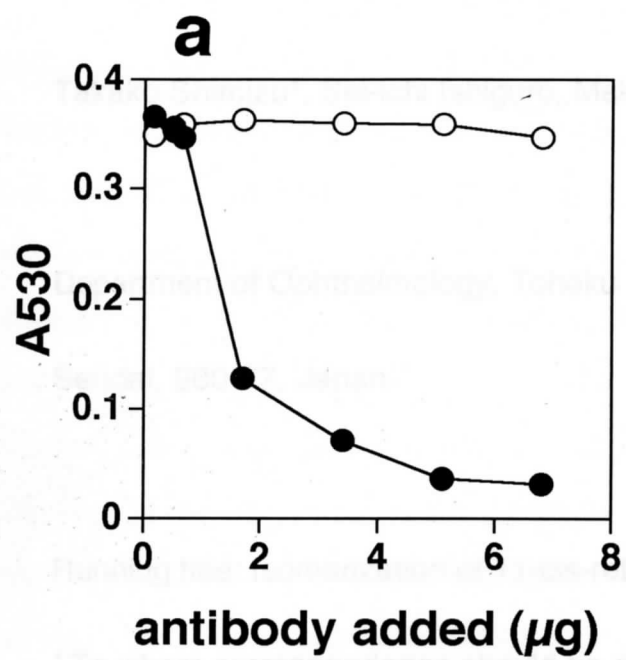
936 CysGluSerGluGlyTrpLeuLeuGluLysSerValProGluThrTrpLysAlaPheLeu 320  
TGCGAGAGTGAGGGCTGGCTTCTGGAGAAGAGCGTGCCGGAGACCTGGAAGGCCTTTCTG

996 GluSerValLysLysLeuGlyLysGlyAsnGlnValGluAlaGluGlyGluAspAlaGly 340  
GAGAGTGTGAAGAAGCTGGGCAAGGGCAACCAGGTGGAAGCCGAGGGCGAGGACGCAGGC

1056 GlnAlaProAlaAlaGly\*\*\* 346  
CAGGCCCCGGCGGCAGGCTGACGGCCCTGCGGCCCCCTCCCCTCTGCACACTGAAAAGTA

1116 GTGGACTCCAGGAACCTTCGGATACCCCCGGATCCCATCAGAATCTCCCAAAGAGGGCGG

1176 CCGTCTCACAGAGGCTCTTCTGGATGTGGGATTTAATATTACAGGGCCC





本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。